

Biomédica 2002;22:524-8

COMUNICACIÓN BREVE

Inoculación experimental de *Terminalia catappa* con un aislamiento ambiental de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotipo C

Patricia Escandón, Sandra Huérfano, Elizabeth Castañeda

Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

En 1997, nuestro laboratorio informó por primera vez el aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotipo C asociado con detritus del árbol de almendro, *Terminalia catappa*. Este hallazgo ha llevado a realizar un seguimiento más detallado de la asociación planta-hongo. Datos preliminares habían revelado que la supervivencia del hongo en plántulas de almendro ocurría hasta por 100 días. El propósito de este estudio fue establecer si bajo las mismas condiciones, *C. neoformans* var. *gattii* podría permanecer viable por un mayor período de tiempo. Se emplearon 83 plántulas de almendro, de 20 a 40 cm de altura, inoculados con *C. neoformans* var. *gattii*, serotipo C (INS-755). Se realizaron ensayos inoculando el tallo o el suelo en el que serían sembradas las plántulas. Las observaciones se realizaron por un período de hasta 12 meses. Como técnicas de procesamiento del material vegetal se emplearon las técnicas de hongos endófitos (tallos), maceración (raíz, hojas) y el estándar de suspensión (suelos). Adicionalmente, el hongo fue visualizado microscópicamente en el tejido vegetal con el empleo de azul de tripán y lactofenol. Se observó que *C. neoformans* var. *gattii* permanecía viable en la planta hasta por 12 meses posinoculación y que podía migrar desde el suelo hacia el tallo y viceversa, sin causar alteraciones macroscópicas ni microscópicas en la planta. Lo anterior sugiere una posible asociación ambiental entre el hospedero *T. catappa* y *C. neoformans* var. *gattii*.

Palabras clave: *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, ecología, almendros.

Experimental inoculation of *Terminalia catappa* seedlings with an environmental isolate of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype C

In 1997, our laboratory reported for the first time the isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype C associated with almond tree (*Terminalia catappa*) detritus. This finding led to a more detailed follow up of the association between the plant and the yeast. Preliminary data have shown that survival of the yeast in almond trees seedlings goes beyond 100 days. The aim of the present study was to establish if under the conditions previously studied, *C. neoformans* var. *gattii* would remain viable for longer periods. A total of 83 almond tree seedlings, 20-40 cm high, were inoculated with *C. neoformans* var. *gattii* serotype C (INS-755). Assays were carried out inoculating the stem or the soil where the seedlings were planted. Observations were undertaken for a period of up to 12 months. As processing techniques we employed the endophytic fungi procedure (stems), maceration (roots, leaves) and standard suspension method (soils). Additionally, microscopic visualization of the yeast in plant tissues was done with trypan blue plus lactophenol. *C. neoformans* var. *gattii* was recovered from the inoculated plants for a period of up to 12 months post-inoculation; additionally, the fungus had the capacity to migrate from the stem to the soil and viceversa, without causing macroscopic or microscopic alterations in the plant tissues. This finding suggests that there appears to be an association between the host plant and *C. neoformans* var. *gattii* in the environment.

Key words: *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, ecology, almond trees.

Actualmente, con base en sus características morfológicas, bioquímicas y genéticas, *Cryptococcus neoformans* se clasifica en tres variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D), *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A) y *C. neoformans* var. *gattii* (serotipo B y C), además de un híbrido (serotipo AD) (1-3).

El hábitat de las variedades *grubii* y *neoformans* está ampliamente relacionado con suelos ricos en excrementos de aves (4), pero a partir de 1988 estas variedades también se han encontrado asociadas con material vegetal (5,6). En 1990, Ellis y Pfeiffer informaron por primera vez sobre el aislamiento de *C. neoformans* var. *gattii* serotipo B a partir de detritos de *Eucalyptus camaldulensis* (7); tiempo después se informó en Brasil su aislamiento a partir de otros árboles como Moquilea (oitíes) y Acacia (8,9). Adicionalmente, *C. neoformans* var. *gattii* serotipo C se recuperó por primera vez a partir de detritos de almendro (*Terminalia catappa*) provenientes de Cúcuta, Norte de Santander (10).

A partir de este hallazgo, nuestro grupo inició estudios encaminados a determinar con mayor detalle la posible asociación del hongo con la planta y a evaluar la supervivencia de *C. neoformans* var. *gattii* en el tejido vegetal. En estos primeros estudios se encontró que el hongo puede permanecer viable en la planta por un período de hasta 100 días (11), lo cual nos condujo a continuar con estos estudios con el objetivo de determinar si *C. neoformans* var. *gattii* permanecería viable dentro de la planta por períodos mayores.

Materiales y métodos

Plántulas de almendro

Se emplearon 83 almendros (*T. catappa*), de 20-40 cm de altura, los cuales se mantuvieron en condiciones de laboratorio a una temperatura aproximada de 27 °C, proporcionándoseles agua cada tercer día.

Correspondencia:

Elizabeth Castañeda, Avenida calle 26 No. 51-60, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 220 0929; fax: (571) 222 1093
ecastaneda@ins.gov.co

Recibido: 11/10/02; aceptado: 29/11/02

Inóculo de *C. neoformans*

Para la inoculación de los almendros se empleó la cepa de *C. neoformans* var. *gattii*, serotipo C (INS-755), ajustando el inóculo a diversas concentraciones, partiendo de diluciones correspondientes a 10^6 - 10^8 UFC/ml.

Inoculación en tallo

Se realizaron 5 ensayos de inoculación en el tallo haciendo una o tres incisiones en el mismo. Las características de cada ensayo se encuentran descritas en el cuadro 1. Para la inoculación se siguió el procedimiento descrito previamente (11).

Inoculación en suelo

Se realizaron dos ensayos de inoculación en el suelo donde posteriormente se plantarían los almendros, con 18 plántulas en el primero y 12 en el segundo. La observación se hizo durante 12 meses. Los inóculos empleados en cada ensayo fueron de $9,4 \times 10^6$ y $5,2 \times 10^7$ UFC/g, respectivamente. Después de la inoculación, el suelo se dejó en reposo 24 horas con el fin de que la tierra absorbiera el inóculo (12).

Pruebas de viabilidad

Para los ensayos de inoculación tanto en tallo como en suelo, se realizaron mensualmente pruebas de viabilidad en las hojas y el suelo. Se emplearon como técnicas de procesamiento, la técnica de hongos endófitos para los tallos (13), maceración para las raíces y hojas (13) y técnicas de suspensión estándar para el suelo (10).

Recuperación e identificación de aislamientos

Para la recuperación de *C. neoformans* se emplearon como medios de cultivo el agar ácido cafeico (14) y el agar con extracto de semillas de Guizottia suplementado con antibióticos (15). Las colonias pigmentadas sugestivas de *C. neoformans* se identificaron con pruebas bioquímicas (16), crecimiento en CGB (17) y serotipificación (18).

Visualización microscópica

Se siguió el protocolo descrito previamente (19). Se realizaron cortes superficiales de los tallos en forma tangencial, cortes que se clarificaron por ebullición en lactofenol-etanol (1:2 v/v) y

Cuadro 1. Inoculación en tallo de plántulas de almendro con *C. neoformans* var. *gattii* serotipo C.

Ensayo No.	Plántulas (n)	Observación (meses)	Inóculo x 10 ⁷ (UFC)	Período máximo de recuperación (meses)	% Recuperación		Visualización microscópica	
					Tallo	Suelo	Observación (meses)	% positividad
1 ^a	13	8	63	8	40	20	8	40
2 ^a	10	8	2,2	3	33,3	0	NR	NR
3 ^a	20	12	1,3	9	50	0	NR	NR
4b	4	1	3,9	1	100	0	1	100
5b	6	3	3,8	3	100	0	1	50

a: 1 incisión

b: 3 incisiones

NR: no realizado

posteriormente se tiñeron con azul de tripán en lactofenol (0,05%). La observación de las estructuras de los tallos en búsqueda del hongo y de alteraciones microscópicas se realizó directamente bajo el microscopio óptico.

Resultados

Los resultados obtenidos en los cinco ensayos de inoculación en tallo se encuentran en el cuadro 1. La recuperación de *C. neoformans* var. *gattii* fue de 50%, nueve meses después de la inoculación. Adicionalmente, en las plantas inoculadas en el tallo con una concentración de $6,3 \times 10^8$ UFC (ensayo 1), el hongo fue recuperado

del suelo en 20% de las muestras, ocho meses después de la inoculación y se visualizó en el tejido vegetal en el 40% de las muestras.

Los resultados correspondientes a los ensayos de inoculación en suelo señalaron que la recuperación fue del 100% a partir del suelo, 12 meses posinoculación en los dos ensayos. Adicionalmente, en el primer ensayo, el hongo fue recuperado de las raíces en dos almendros y en seis tallos a los tres meses posinoculación.

No se observaron alteraciones macroscópicas ni microscópicas en el tejido vegetal de los almendros inoculados. Como se observa en la figura 1, fue

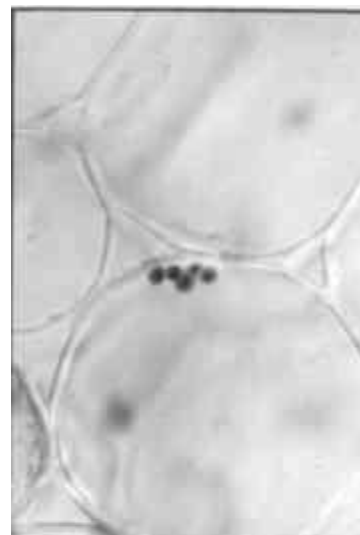
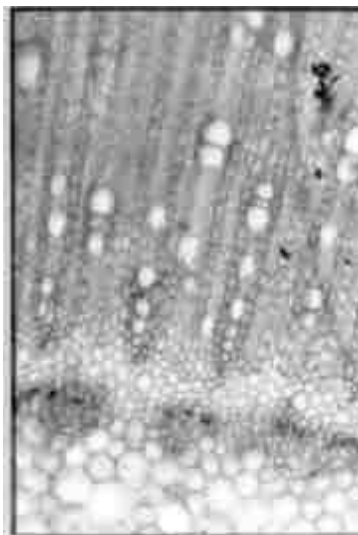


Figura 1. Corte de tallo inoculado con *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotipo C. Coloración azul de tripán más lactofenol. A) corteza, 40X; B) médula, 100X; se observan blastoconidias en la médula.

posible apreciar células de la levadura dentro del tejido vegetal, pero sin que éste presentara alteraciones.

Discusión

T. catappa, igualmente conocido como el almendrón de la India, se encuentra distribuido en las áreas tropicales de América y es uno de los árboles más difundidos en Colombia y en parques y avenidas de Cúcuta, Norte de Santander (20). Fue precisamente de un árbol de esta ciudad del cual se logró el primer aislamiento ambiental de *C. neoformans* var. *gattii* serotipo C a partir de detritos de almendro (10). Ello condujo a estudios posteriores acerca del hábitat de este hongo y de su asociación con esta planta hospedera en el ambiente (11).

Los resultados relacionados con la supervivencia del hongo en las plántulas de almendro hasta por 12 meses, sugieren que *C. neoformans* var. *gattii* puede establecer una asociación con el hospedero en su ambiente, ya que es capaz de permanecer viable en el tejido vegetal por largos períodos y tiene la capacidad de migrar desde el tallo hacia el suelo y viceversa, sin ocasionar daño aparente en la planta. La migración desde los tallos inoculados al suelo sin inocular sólo se observó en el experimento en el que se empleó el mayor inóculo, lo que podría sugerir un efecto de dosis.

El hecho de que no se hayan presentado alteraciones macroscópicas ni microscópicas en el tejido vegetal de las plántulas inoculadas, permite suponer que el almendro puede actuar como un hospedero intermediario para el hongo, con el cual establece una asociación similar a la descrita por Ellis y Pfeiffer (21).

Los resultados obtenidos en este estudio señalan la necesidad de conocer más acerca de la ecología de *C. neoformans* var. *gattii* y sobre su asociación con la planta hospedera, así como sobre su ciclo de vida en la naturaleza.

Referencias

1. Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. J Clin Microb 1999;37:838-40.
2. Casadevall A, Perfect J. *Cryptococcus neoformans*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press; 1998.
3. Lengeler KB, Cox GM, Heitman J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating type locus. Infect Immun 2001;69:115-22.
4. Emmons CW. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. J Bacteriol 1951;62:685-9.
5. Swinnie D. Ecology of *Cryptococcus neoformans* and epidemiology of cryptococcosis in the old world. En: Torres-Rodríguez JM, editor. Proceedings of the X Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Barcelona, 1988. p.113-9.
6. Lazera MS, Pires FDA, Camillo-Coura L, Nishikawa MM, Bezerra CCF, Trilles L, et al. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. J Med Vet Mycol 1996;34:127-31.
7. Ellis DH, Pfeiffer TC. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiol 1990;28:1642-4.
8. Lazera MS, Cavalcanti MA, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. Med Mycol 1998;36:119-22.
9. Lazera MS, Salmito MA, Londero AT, Trilles L, Nishikawa L, Wanke B. Possible primary ecologic niche of *Cryptococcus neoformans*. Med Mycol 2000; 38:379-83.
10. Callejas A, Ordóñez N, Rodríguez MC, Castañeda E. First isolation of *C. neoformans* var. *gattii* serotype C from the environment in Colombia. Med Mycol 1998;36: 341-4.
11. Huérfano S, Castañeda A, Castañeda E. Experimental infection of almond trees seedlings (*Terminalia catappa*) with an environmental isolate of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C. Rev Iberoam Micol 2001;18:131-2.
12. Dhingra OD, Sinclair JB. Basic plant pathology methods. Boca Ratón: CRC Press; 1987.
13. Agudelo C, Arboleda M, Vargas M. Manual del laboratorio de fitopatología. Bogotá: Universidad de Los Andes; 1996.
14. McGinnis MR. Laboratory handbook of medical mycology. San Diego: Academic Press; 1980.
15. Shields A. Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. Science 1996;151:208-9.
16. Kwon-Chung KJ, Wickes B, Stockman L, Roberto GD, Ellis DH, Howard DH. Virulence, serotype, and

- molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. Infect Immun 1992;60:1869-74.
17. **Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennet JE.** Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). J Clin Microbiol 1982;15:535-7.
 18. **Ikeda R, Shinoda T, Fukazawa Y, Kaufman L.** Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. J Clin Microbiol 1982;16:22-9.
 19. **Menéndez A, Bertoni MD, Cabral D.** Endófitos fúngicos en *Juncus imbricatus* var. *chamissonis*: identificación de los patrones de colonización. Rev Iberoam Micol 1997;14:125-8.
 20. **Convenio Andrés Bello.** Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello. Tomo IV. Bogotá: Secretaria Ejecutiva del Convenio Andrés Bello; 1990.
 21. **Ellis DH, Pfeiffer TC.** Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. Lancet 1990;336:923-5.